

12

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: **79104098.3**

61 Int. Cl.<sup>3</sup>: **C 12 Q 1/54, G 01 N 33/66**

22 Anmeldetag: **23.10.79**

30 Priorität: **22.11.78 DE 2850603**

71 Anmelder: **Merck Patent Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Frankfurter Strasse 250, D-6100 Darmstadt (DE)**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: **25.06.80 Patentblatt 80/13**

64 Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT NL SE**

72 Erfinder: **Vormbrock, Rolf, Dr., Grundstrasse 17, D-6100 Darmstadt (DE)**  
Erfinder: **Helger, Roland, Dr., Ludwigshöhstrasse 85, D-6100 Darmstadt (DE)**

54 **Hämolyserlösung, Verwendung einer solchen für die Bestimmung von Glucose im Blut, und Hämolyseverfahren.**

57 Eine wässrige Hämolyserlösung, die nach Vermischen mit Blut dessen Glucosegehalt zu bestimmen erlaubt, enthält als gelöste Bestandteile im wesentlichen einen Puffer (z. B. Phosphatpuffer pH 7,6), Natriumchlorid, mindestens einen Chelatbildner (z. B. EDTA) und mindestens ein Tensid (z. B. Polyoxyäthylen-10-alkylphenoläther) sowie zweckmäßig noch ein Alkaliazid (z. B. Natriumazid). Eine derartige Hämolyserlösung ist praktisch unbegrenzt haltbar; die Glucosekonzentration im mit ihr hydrolysiertem Blut ist nach zwölf Tagen noch unverändert.

**EP 0 012 184 A1**

Hämolysierlösung und Verfahren zur  
Hämolyse von Blut

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Hämolysier-  
lösung sowie ein Verfahren zur Hämolyse von Blut und  
zur Stabilisierung der Glucosekonzentration in hämo-  
5 lysiertem Blut.

Die Bestimmung der Glucosekonzentration im Vollblut  
wird wegen des geringen Arbeitsaufwandes einer Be-  
stimmung in Plasma oder Serum vorgezogen. Ein weiterer  
10 Vorteil bei der Verwendung von Vollblut besteht darin,  
daß bereits eine sehr geringe Menge Blut (z.B. 20  $\mu$ l)  
für eine Bestimmung ausreicht. In der entnommenen Blut-  
probe bewirken jedoch die in den Erythrozyten ent-  
haltenen Enzyme einen glykolytischen Abbau der vor-  
15 handenen Glucose. Aus diesem Grund muß die Glucose-  
bestimmung entweder unverzüglich nach der Blutentnahme  
durchgeführt werden oder die Glykolyse muß durch ge-  
eignete Methoden inhibiert werden. Die Inhibierung  
kann sowohl in isotonischer Lösung ohne Hämolyse er-  
20 folgen als auch nach der Hämolyse der Probe, die z.B.  
durch osmotischen Schock oder mittels Digitonin hervor-  
gerufen werden kann.

In der Literatur sind bereits eine Reihe von Inhibitoren  
der Glykolyse beschrieben worden, z.B. Fluoride, Halogen-  
25 acetate, N-Alkylmaleinimide, Essigsäure usw. Der Haupt-

- nachteil der bekannten, diese Inhibitoren enthaltenden Hämolyserlösungen für die Glucosebestimmung in Vollblut besteht darin, daß diese Lösungen entweder nur eine begrenzte Zeit stabil sind oder die Glykolyse nicht vollständig inhibieren. So beträgt z.B. die Haltbarkeit der Hämolyserlösung nach der DE-AS 18 13 848 nur etwa 3-4 Wochen, d.h., diese Lösungen müssen in geringen Zeitabständen frisch angesetzt werden, um sicher zu sein, daß sie noch voll funktionsfähig sind.
- 5
- 10 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Hämolyserlösung für die Glucosebestimmung im Vollblut zur Verfügung zu stellen, die gut hämolysiert, die Glykolyse hemmt und praktisch unbegrenzt haltbar ist.
- 15 Erfindungsgemäß wurde diese Aufgabe durch eine Hämolyserlösung gelöst, die neben einem Puffer und Natriumchlorid einen Chelatbildner und ein Tensid enthält.
- 20 Gegenstand der Erfindung ist demnach eine Hämolyserlösung für die Glucosebestimmung im Blut, die im wesentlichen einen Puffer und Natriumchlorid enthält und die gekennzeichnet ist durch einen Gehalt an mindestens einem Chelatbildner und mindestens einem Tensid.
- 25 Ferner umfaßt der Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Hämolyse von Blut und zur Stabilisierung der enthaltenen Glucosekonzentration, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Vollblut mit einer wäßrigen Hämolyserlösung behandelt, die im wesentlichen Puffer, Natriumchlorid, Chelatbildner und Tensid enthält.
- 30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung besteht in der Verwendung einer Kombination aus mindestens einem Chelatbildner und mindestens einem Tensid in Hämolyserlösungen für die Glucosebestimmung im Blut.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß die Kombination aus Chelatbildner und Tensid eine vollständige Inhibierung der Glykolyse im Hämolytat bewirkt und außerdem eine stabile Hämolytatlösung erhalten wird. Chelatbildner wie Äthylendiamintetraacetat, die durch Komplexbildung zweiwertiger Metallkationen eine Reihe von Enzymen der Glykolyse zu inhibieren vermögen, sind bisher nicht als Stabilisatoren in Hämolytatlösungen verwendet worden, weil Chelatbildner allein keine effektive Hemmung der Glykolyse im Blut bewirken; bei einer Äthylendiamintetraacetatkonzentration von z.B. 1 g/l wird die im Blut enthaltene Glucose vielmehr abgebaut. Die Glucosekonzentration im mit der erfindungsgemäßen Hämolytatlösung hergestellten Hämolytat ist dagegen nach 12 Tagen immer noch unverändert. Ein zusätzlicher Vorteil der erfindungsgemäßen Hämolytatlösung besteht darin, daß im Hämolytat keine Trübung auftritt.

Als Tenside eignen sich ionische Tenside, wie Natriumdo-decylsulfat, Cetyltrimethylammoniumbromid, Laurylsarkosin oder Tauroglycocholat, vor allem nichtionische Tenside, vorzugsweise Alkylphenolpolyglykoläther.

Geeignete Chelatbildner sind z.B. Äthylendiamintetraacetat, Nitriлотriacetat, Cyclohexylen-(1,2)-dinitriлотetraacetat, Diäthylentriaminpentaacetat, Bis-(aminoäthyl)-glykoläther-N,N,N',N'-tetraacetat, vorzugsweise Äthylendiamintetraacetat.

In der Hämolytatlösung können jeweils auch Kombinationen der Chelatbildner und Tenside eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Hämolyserlösung enthält die Tenside in einer Konzentration von 1 - 4 g/l, vorzugsweise 2 g/l; die Chelatbildner sind in einer Konzentration von 0,5 bis 2 g/l, vorzugsweise 1 g/l  
5 enthalten.

Die Hämolyserlösung enthält darüber hinaus noch mindestens einen Puffer und Natriumchlorid. Der Puffer dient dazu, den pH-Wert der Hämolyserlösung in einem für die Glucosebestimmung geeigneten Bereich von etwa  
10 6 - 8 einzustellen. Als geeignete Puffer haben sich z.B. Phosphat-, Tris-, Triäthanolamin- oder Imidazolpuffer in einer Konzentration von 50 - 500 mmol/l erwiesen, bevorzugt wird ein Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,6 in einer Konzentration von 120 mmol/l verwendet.

15 Die Natriumchloridkonzentration sollte größer als 0,8 mol/l sein, vorzugsweise etwa 1 mol/l.

Zur Vermeidung mikrobieller Kontamination können noch 5 - 120 mmol/l eines Alkaliazids zugesetzt werden, vorzugsweise 14 mmol/l Natriumazid.

20 Die Hämolyse von Vollblut unter gleichzeitiger Stabilisierung der enthaltenen Glucosekonzentration erfolgt in der Weise, daß man das zu untersuchende Vollblut mit der erfindungsgemäßen wäßrigen Hämolyserlösung aufnimmt und anschließend oder aber erst nach einigen Tagen  
25 mit dieser Lösung die enzymatische Glucosebestimmung nach den üblichen Methoden vornimmt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

### Beispiel 1

20 µl Blut werden unmittelbar nach der Blutab-  
5 nahme in 2 ml einer Hämolysierlösung aufgenommen, die folgende Zusammensetzung hat:

120 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,6  
1 mol/l Natriumchlorid  
14 mmol/l Natriumazid  
10 1 g/l Äthylendiamintetraacetat und  
2 g/l Polyoxyäthylen-10-alkylphenoläther (Lutensol<sup>(R)</sup>  
AP 10).

1 ml dieser Lösung wird in eine Küvette pipettiert und mit  
2 ml Pufferlösung folgender Zusammensetzung versetzt:

15 120 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,6  
150 mmol/l Natriumchlorid  
14 mmol/l Natriumazid  
2,8 mmol/l Äthylendiamintetraacetat  
3,6 mmol/l Nicotinamidadenindinucleotid und  
20 150 U/l Mutarotase.

Die Extinktion der Lösung wird bei einer Wellenlänge von  
340 nm oder mit Filter Hg 334 oder Hg 365 gemessen, dann  
wird durch Zugabe von 20 µl Enzymlösung, die 500 kU/l Glu-  
cosedehydrogenase enthält, die Reaktion gestartet. Nach  
25 etwa 5 Minuten ist die Reaktion beendet und die Extinktion  
wird abgelesen. Aus der Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  errechnet  
sich die Glucosekonzentration der untersuchten Probe nach  
der Gleichung:

Glucosekonzentration  $c = \Delta E_{334} \times 889,2 \text{ mg/dl}$ .

Die Glucosekonzentration bleibt über Wochen konstant, die Hämolyserlösung ist unbegrenzt stabil.

### Beispiel 2

- 5 Analog Beispiel 1 wurde die Glucosekonzentration in einer hämolysierten Blutprobe bestimmt, wobei das Hämolysat in 6 Teile geteilt wurde, die jeweils im Abstand von einigen Tagen gemessen und ausgewertet wurden. Zum Vergleich wurden Blutproben gemessen, die mit einer Hämolyserlösung  
10 behandelt waren, die Natriumfluorid an Stelle der Kombination aus Chelatbildner und Tensid enthielt.

- Die nachstehende Tabelle gibt die Glucosekonzentration der verschiedenen Hämolysate in % des Anfangswertes wieder. Die Werte wurden mit Proben erhalten, die 70 mg/dl  
15 Glucose enthielten.

Stabilisator	Aufbewahrungszeit (Tage)					
	1	2	5	7	9	12
20 EDTA 1,0 g/l						
Tensid 2,0 g/l	102	103	103	102	102	103
NaF 0,5 g/l	98,7	94,1	88,3	86,3	86,3	78,5

- 25 Aus der Tabelle geht hervor, daß die Glucosekonzentration in den mit der erfindungsgemäßen Hämolyserlösung hergestellten Hämolysaten im Versuchszeitraum konstant bleibt, während in den Natriumfluorid enthaltenden Hämolysaten die Glucosekonzentration ständig abnimmt.

Merck Patent Gesellschaft  
mit beschränkter Haftung  
D a r m s t a d t

Patentansprüche

1. Hämolysierlösung für die Glucosebestimmung im Blut, im wesentlichen enthaltend einen Puffer und Natriumchlorid, gekennzeichnet durch einen  
5 Gehalt an mindestens einem Chelatbildner und mindestens einem Tensid.
2. Hämolysierlösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Tenside nichtionische Tenside enthalten sind.
- 10 3. Hämolysierlösung nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Tenside Alkylphenolpolyglykoläther enthalten sind.
4. Hämolysierlösung nach den Ansprüchen 1 bis 3, da-  
15 durch gekennzeichnet, daß als Chelatbildner Äthylen-  
diamintetraacetat, Nitrilotriacetat, Cyclohexylen-  
(1,2)-dinitrilotetraacetat, Diäthylentriaminpenta-  
acetat und/oder Bis-(aminoäthyl)-glykoläther-N,N,  
N',N'-tetraacetat enthalten sind.

5. Hämolysierlösung nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Tenside in einer Konzentration von 1 bis 4 g/l enthalten sind.
- 5 6. Hämolysierlösung nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Chelatbildner in einer Konzentration von 0,5 bis 2 g/l enthalten sind.
- 10 7. Hämolysierlösung nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Natriumazid enthalten ist.
- 15 8. Verfahren zur Hämolyse von Blut und zur Stabilisierung der enthaltenen Glucosekonzentration, dadurch gekennzeichnet, daß man Vollblut mit einer wäßrigen Hämolysierlösung behandelt, die im wesentlichen Puffer, Natriumchlorid, Chelatbildner und Tensid enthält.
- 20 9. Verwendung einer Kombination aus mindestens einem Chelatbildner und mindestens einem Tensid in Hämolysierlösungen für die Glucosebestimmung im Blut.



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.) 3
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
	<p><u>US - A - 3 953 295</u> (MONTE et al.) + Spalte 8, Zeilen 7-11 und Tabelle 1, Formulierung A + --</p> <p><u>US - A - 3 634 290</u> (GOLIAS) + Gesamt + -----</p>	<p>1,2,8</p> <p>1,4</p>	<p>C 12 Q 1/54 G 01 N 33/66</p>
			<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.) <input checked="" type="checkbox"/> 3</p>
			<p>C 12 Q G 01 N</p>
			<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X: von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &amp;: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>
<input checked="" type="checkbox"/>	Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
WIEN	24-01-1980	SCHNASS	